

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing: 29 March 2001 (29.03.01)	
International application No.: PCT/JP00/06566	Applicant's or agent's file reference: FI-2400
International filing date: 25 September 2000 (25.09.00)	Priority date: 24 September 1999 (24.09.99)
Applicant: KAWABATA, Takahiro et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

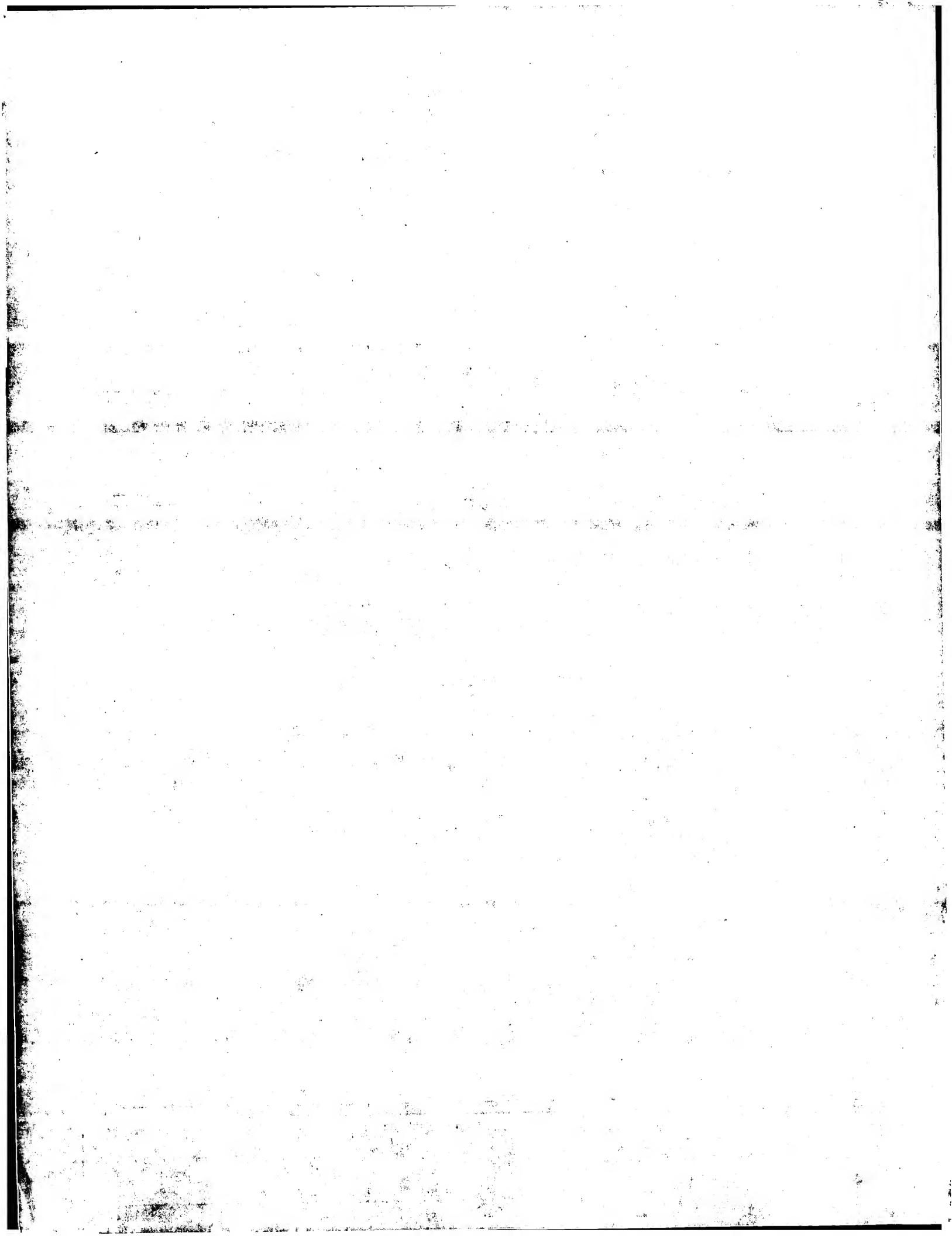
23 January 2001 (23.01.01)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election was was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer: J. Zahra Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	---



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl' B09B3/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, A62D3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' B09B3/00, B09B5/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, C02F3/00,
A62D3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 4765901, A (Pacques B.V., Balk, Netherlands), 23 August, 1988 (23.08.88), Claims & JP, 62-237999, A Claims & EP, 238148, A & NL, 8600723, A & FI, 8701215, A & DE, 3764679, G & ES, 2017700, B & CA, 1307361, C & SU, 4202256, A	1-3,5-11, 13-22
A		1-23
PX	JP, 2000-186272, A (Sanrou TACHIBANA), 04 July, 2000 (04.07.00), Claims; Par. Nos. 1, 14 (Family: none)	1-3,5-18, 21-22
X	WO, 9728257, A (NOVO NORDISK A/S), 07 August, 1997 (07.08.97), Claims & JP, 9-206071, A Claims & AU, 9714382, A & EP, 877800, A & CN, 1209839, A	1-3,5-11,13-14 ,16-22
A		1-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



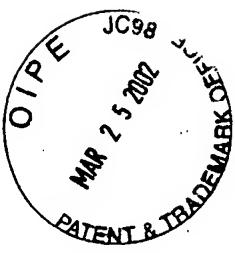
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06566

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 9715354, A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT), 01 May, 1997 (01.05.97), Claims; page 3, line 16 & JP, 11-514274, A Claims; page 5, line 15 & AU, 9672902, A & EP, 858357, A & CN, 1200678, A & DE, 59602194, G & US, 6046045, A & KR, 99064009, A & HU, 9802982, A & ES, 2135254, T	1-2, 5-11, 13-18 , 21
A		1-23



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OHTANI, Tamotsu
 Tomoe-cho Annex-II, 4th floor
 8-27, Toranomon 3-chome
 Minato-ku
 Tokyo 105-0001
 JAPON



Date of mailing (day/month/year) 29 March 2001 (29.03.01)
--

Applicant's or agent's file reference FI-2400	IMPORTANT NOTICE	
International application No. PCT/JP00/06566	International filing date (day/month/year) 25 September 2000 (25.09.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
Applicant IDEMITSU KOSAN CO., LTD. et al		

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
 AU,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
 AE,AG,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EA,EE,EP,ES,
 FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,
 MW,MX,MZ,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,
 The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).
3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on
 29 March 2001 (29.03.01) under No. WO 01/21332

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a **demand for international preliminary examination** must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

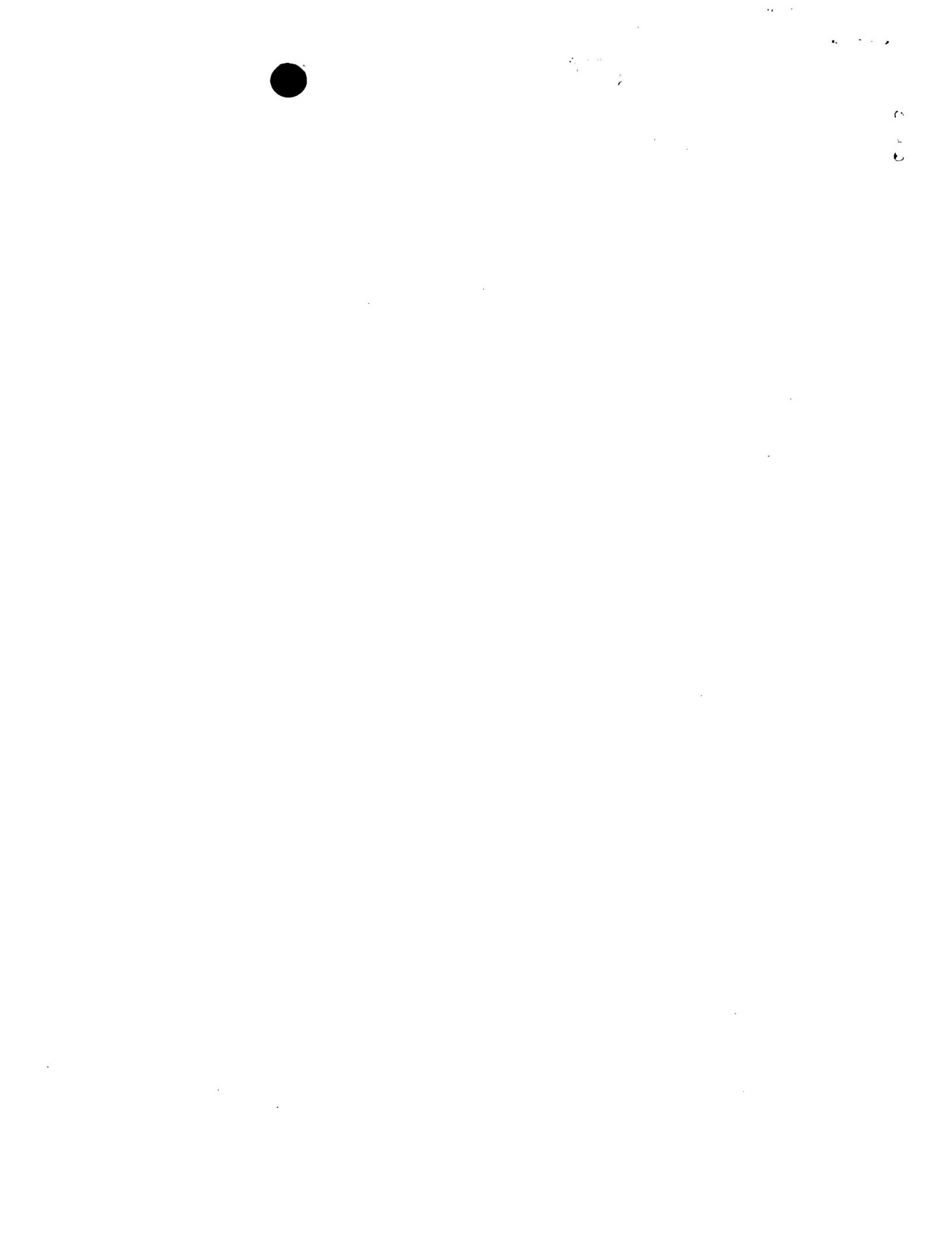
Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the **national phase**, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer J. Zahra Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---



特許協力条約

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)

REC'D 26 OCT 2001

WIPO PCT

出願人又は代理人 の書類記号 F I - 2 4 0 0	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPOO/06566	国際出願日 (日.月.年) 25.09.00	優先日 (日.月.年) 24.09.99
国際特許分類 (IPC) Int. C1' B09B3/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, A62D3/00		
出願人（氏名又は名称） 出光興産株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 4 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で _____ ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I 国際予備審査報告の基礎
- II 優先権
- III 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV 発明の単一性の欠如
- V PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ある種の引用文献
- VII 国際出願の不備
- VIII 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 23.01.01	国際予備審査報告を作成した日 16.10.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 中野 孝一  電話番号 03-3581-1101 内線 3421
	4D 9153

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。（法第6条（PCT14条）の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17）

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲	第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面	第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分	第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- 國際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 _____ ページ
- 請求の範囲 第 _____ 項
- 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。（PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。）

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲	4, 7-10, 12, 17-20, 23	有
請求の範囲	1-3, 5-6, 11, 13-16, 21-22	無

進歩性 (I S)

請求の範囲	4, 12, 23	有
請求の範囲	1-3, 5-11, 13-22	無

産業上の利用可能性 (I A)

請求の範囲	1-23	有
請求の範囲		無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-3, 5-6, 11, 13-16, 21-22

請求の範囲 1-3, 5-6, 11, 13-16, 21-22に記載された発明は、文献1：US 4765901 A(Pacques B.V., Balk, Netherlands)23.8月.1988(23.08.88), 請求の範囲、文献2：WO 9728257 A(NOVO NORDISK A/S)7.8月.1997(07.08.97), 請求の範囲、文献3：WO 9715354 A(BAYER AKTIENGESELLSCHAFT)1.5月.1997(01.05.97), 請求の範囲、第3頁第16行に記載された発明とその構成が一致しており、新規性を有しない。

請求の範囲 7-10, 17-20

請求の範囲 7-10, 17-20に記載された発明は、文献1-3により進歩性を有しない。微生物担体の材質及び形状を選択すること、並びに磁性体微粒子を担体として使用することは、当業者が適宜なし得ることである。

請求の範囲 4, 12, 23

請求の範囲 4, 12, 23に記載された発明は進歩性を有する。有害物質として、請求の範囲 4, 12, 23で特定されたものを処理対象とすることは、文献1-3に記載も示唆もされていない。

VI. ある種の引用文献

1. ある種の公表された文書 (PCT規則70.10)

出願番号 特許番号	公知日 (日.月.年)	出願日 (日.月.年)	優先日 (有効な優先権の主張) (日.月.年)
JP 2000-186272 A 請求の範囲、段落1及び14 「P, X」	04.07.00	26.03.99	16.10.98

2. 書面による開示以外の開示 (PCT規則70.9)

書面による開示以外の開示の種類	書面による開示以外の開示の日付 (日.月.年)	書面による開示以外の開示に言及している 書面の日付 (日.月.年)

77
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference FI-2400	FOR FURTHER ACTION	See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)
International application No. PCT/JP00/06566	International filing date (day/month/year) 25 September 2000 (25.09.00)	Priority date (day/month/year) 24 September 1999 (24.09.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC B09B 3/00, B01D 53/34, C02F 1/58, 1/72, A62D 3/00		
Applicant IDEMITSU KOSAN CO., LTD.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 23 January 2001 (23.01.01)	Date of completion of this report 16 October 2001 (16.10.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06566

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the drawings:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

 the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

P JP 00/06566

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	<u>4, 7-10, 12, 17-20, 23</u>	YES
	Claims	<u>1-3, 5-6, 11, 13-16, 21-22</u>	NO
Inventive step (IS)	Claims	<u>4, 12, 23</u>	YES
	Claims	<u>1-3, 5-11, 13-22</u>	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	<u>1-23</u>	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-3, 5-6, 11, 13-16 and 21-22

The inventions set forth in Claims 1-3, 5-6, 11, 13-16 and 21-22 are not novel, because the constitution thereof coincides with that of inventions disclosed in Document 1 (US, 4765901, A (Pacques B.V., Balk, Netherlands), 23 August 1988 (23.08.88); claims), Document 2 (WO, 9728257, A (Novo Nordisk A/S), 7 August 1997 (07.08.97); claims) and Document 3 (WO, 9715354, A (Bayer AG), 1 May 1997 (01.05.97); claims and page 3, line 16).

Claims 7-10 and 17-20

The inventions set forth in Claims 7-10 and 17-20 do not involve an inventive step in the light of Documents 1-3. Selection of wood as a support for microorganism and the shape thereof, and use of fine magnetic particles as a support, are routine options available to a person skilled in the art.

Claims 4, 12 and 23

The inventions set forth in Claims 4, 12 and 23 involve an inventive step. Documents 1-3 do not suggest treatment of any of the harmful substances specified in Claims 4, 12 and 23.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/06566

VI. Certain documents cited**1. Certain published documents (Rule 70.10)**

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
-------------------------------	--------------------------------------	---------------------------------	---

*See supp.sheet

2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)
--------------------------------	--	---



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/06566

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

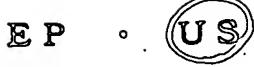
Continuation of: VI 1.

JP, 2000-186272, A 04.07.00 26.03.99 16.10.98

claims, and paragraphs 1 and 14

[P, X]





特許協力条約

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 FI-2400	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO/06566	国際出願日 (日.月.年) 25.09.00	優先日 (日.月.年) 24.09.99
出願人(氏名又は名称) 出光興産株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
 この国際出願に含まれる書面による配列表

この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. 発明の單一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は 出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は 出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 出願人が示したとおりである. なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' B09B 3/00, B01D 53/34, C02F 1/58, C02F 1/72, A62D 3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. Cl' B09B 3/00, B09B 5/00, B01D 53/34, C02F 1/58, C02F 1/72, C02F 3/00, A62D 3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US, 4765901, A (Pacques B. V., Balk, Netherlands) 23.8月.1988 (23.08.88), 請求の範囲 & JP, 62-237999, A, 請求の範囲 & EP, 238148, A & NL, 8600723, A & FI, 8701215, A & DE, 3764679, G & ES, 2017700, B & CA, 1307361, C & SU, 4202256, A	1-3、 5-11、 13-22
A		1-23
P X	JP, 2000-186272, A (橋燐郎) 4.7月.2000 (04.07.00), 請求の範囲, 段落1及び14 (ファミリなし)	1-3、 5-18、 21-22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

中野 孝一

4 D 9153

電話番号 03-3581-1101 内線 3421

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 9728257, A (NOVO NORDISK A/S) 7.8月. 1997 (07.08.97), 請求の範囲 & JP, 9-206071, A, 請求の範囲 & AU, 9714382, A & EP, 877800, A & CN, 1209839, A	1-3, 5-11, 13-14, 16-22 1-23
A		
X	WO, 9715354, A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 1.5月. 1997 (01.05.97), 請求の範囲, 第3頁第16行 & JP, 11-514274, A, 請求の範囲, 第5頁第15行 & AU, 9672902, A & EP, 858357, A & CN, 1200678, A & DE, 59602194, G & US, 6046045, A & KR, 99064009, A & HU, 9802982, A & ES, 2135254, T	1-2, 5-11, 13-18, 21
A		1-23

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月29日 (29.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/21332 A1

- (51) 国際特許分類⁷: B09B 3/00, B01D 53/34, C02F 1/58, 1/72, A62D 3/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06566
- (22) 国際出願日: 2000年9月25日 (25.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
 特願平11/270392 1999年9月24日 (24.09.1999) JP
 特願2000/208788 2000年7月10日 (10.07.2000) JP
 特願2000/211258 2000年7月12日 (12.07.2000) JP
 特願2000/213613 2000年7月14日 (14.07.2000) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 出光興産株式会社 (IDEMITSU KOSAN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒100-0001 東京都千代田区丸の内三丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
 (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 川端孝博 (KAWABATA, Takahiro) [JP/JP]. 宮本秀夫 (MIYAMOTO, Hideo) [JP/JP]. 鈴木源士 (SUZUKI, Motoshi) [JP/JP]; 〒299-0205 千葉県袖ヶ浦市上泉1280番地 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 大谷 保 (OHTANI, Tamotsu); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門三丁目8番27号 巴町アネックス2号館4階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DECOMPOSING REFRACtORY HAZARDOUS SUBSTANCE AND DECOMPOSING AGENT

(54) 発明の名称: 難分解性有害物質の分解方法及び分解剤

(57) Abstract: A method for decomposing a refractory, hazardous substance which comprises contacting the refractory, hazardous substance with laccase and/or microbes producing laccase; and a decomposing agent for a refractory, hazardous substance containing at least one selected from between laccase and microbes producing laccase. The decomposing method and agent can be used for decomposing a refractory, hazardous substance with good efficiency by microbes being excellent in the stability of production of an enzyme to thereby convert it into a non-hazardous substance.

(57) 要約:

難分解性有害物質と、ラッカーゼ及び／又はラッカーゼを生産する微生物とを接触させて該難分解性有害物質を分解する難分解性有害物質の分解方法、及び、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種を含有する難分解性有害物質の分解剤であって、本発明により、難分解性有害物質を、酵素生産の安定性に優れた微生物により効率よく分解して無害化することができる。

WO 01/21332 A1

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

難分解性有害物質の分解方法及び分解剤

技術分野

本発明は、汚染水や土壤中に含まれる難分解性有害物質の分解方法及び該方法に用いられる分解剤に関し、更に詳しくは、農薬中の特定成分、化学工業における原料や製品、更にゴミや産業廃棄物の焼却処理時に生成する特定の化学物質などの上記難分解性有害物質、または、紙、パルプ工業、精密機械関連産業等において洗浄剤などとして用いられている上記難分解性有害物質を分解して無害化する方法、及び該方法に用いられる分解剤に関する。

背景技術

人体に有害な物質としてよく知られている種々の難分解性化学物質は、都市ごみや産業廃棄物の焼却設備や様々な燃焼設備、機器類などから自然界に排出され、また、化学物質の製造工程においては環境に悪影響を及ぼす種々の有機化合物が排出され、大きな社会問題となっている。

このような物質のうち、例えばダイオキシン類等は、生物により分解され難いことから、多くの生物の体内に吸収され、食物連鎖により、最終的には動物体内に蓄積されて濃縮され、発がん性や催奇形成性を示すことが知られている。

そこで、これらダイオキシン類等の発生を抑制する方法が検討、提案されており、例えば、自動車や焼却炉などからの排出ガスを高温燃焼する方法が提案されている。しかしながら、このような方法

においてもダイオキシン類等の発生を充分に抑制できるまでには至っていない。そして、大気中に放出されたダイオキシン類等は、雨水や雪とともに地上に降りて土壌に蓄積される。このように、自然界に放置されたダイオキシン類等を無害化するための有効な手段は見出されていない。

また、難分解性のフェノール類については、活性炭等による吸着分離、活性汚泥などによる分解が行われているが、ハロゲン化フェノール類、アルキルフェノール類、ビスフェノール類、更にはフタル酸エステル類などは、その化学構造から生物的に分解されにくく、環境中に蓄積されやすいという問題があり、これらの化合物もまた食物連鎖により生物濃縮され、人や環境生物に種々の被害をもたらしている。

一方、紙、パルプ工業、精密機械関連産業等工業地域の土壌中には、洗浄剤などとして用いられているテトラクロロエチレン、トリクロロエチレン、ジクロロエチレン等のハロゲン化炭化水素系の難分解性有害物質による汚染がかなりの範囲で拡がっていると考えられており、実際に環境調査等で検出された事例が多数報告されている。これらの難分解性有害物質は土壌中に残留したものが雨水等により地下水中に溶解して周辺地域一帯に拡がるとされている。これらの化合物には発癌性の疑いがあり、また環境中で安定であるため、特に飲料水の水源として利用されている地下水の汚染は深刻な社会問題となっている。

このようなことから、難分解性有害物質の除去、分解による、汚染地下水等の水性媒体、土壌、及びそれに伴う周辺気相の浄化は、環境保全の視点からきわめて重要な課題であり、浄化に必要な種々の技術の開発が行われてきている。

例えば、近年、ダイオキシン類等の自然界では分解されがたい化学物質を微生物により分解する方法に関する研究がなされ、ある種の微生物が産生するリグニン分解酵素がダイオキシン類を分解することが報告されている〔BIO INDUSTRY VOL. 15 NO. 2 P5-13(1998) : 化学 VOL. 52 NO. 10 P24-25(1997)〕。

さらに、上記報告においては、微生物が産生するリグニン分解酵素によるダイオキシン類の分解に関し、担子菌類に属する木材腐朽菌のうち白色腐朽菌が産生するリグニン分解酵素が、ダイオキシン類など様々な化学物質を分解できることが示されている。この白色腐朽菌は、木材中の主成分である多糖類のセルロースやヘミセルロースを栄養源として生育し、これをエネルギーとして木材中のリグニンを分解する旨が述べられている。したがって、この白色腐朽菌が棲息する森林地帯においては、大気中から雨水などとともに地上に降り注いだダイオキシン類等は、白色腐朽菌の産生するリグニン分解酵素によって分解されやすいと考えられる。しかしながら、この白色腐朽菌によるリグニン分解酵素の生産は、培地の組成、特に窒素源の含有割合や、白色腐朽菌の増殖条件に左右されることから、白色腐朽菌の棲息条件によっては全くリグニン分解酵素を生産しないこともあり、安定性に欠けるという問題があった。

また、この白色腐朽菌が棲息する森林地帯を除く多くの地域においては、ダイオキシン類等のさらなる蓄積が進行して、生物への影響が深刻な問題となるおそれが大きい。このような状況から、各種工場、焼却設備などから自然界に排出される難分解性有害物質を含む排気や排水（排液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌などに蓄積された難分解性有害物質を分解して無害化するための技術の開発が強く要望されている。

発明の開示

本発明は、焼却設備、製造設備などから自然界に排出される難分解性有害物質を含む排気や排水（廃液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壤などに蓄積された上記難分解性有害物質を、安定性の高い酵素や安定した酵素生産性を有する微生物による分解によって無害化する方法を提供することを目的とするものである。

本発明者らは、前記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、ラッカーゼまたはラッカーゼを生産する微生物が、上記難分解性有害物質の分解に有効であることを見出し、これらの知見に基づいて本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 難分解性有害物質と、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを接触させて該難分解性有害物質を分解する難分解性有害物質の分解方法、

(2) 難分解性有害物質が、炭素数6以上の難分解性芳香族化合物、又は1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素である上記(1)記載の分解方法、

(3) 炭素数6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、ハロゲン化ビフェニル類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である上記(2)記載の分解方法、

(4) 1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素が、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタ

ン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン及びトリクロロプロピレンから選ばれる少なくとも1種である上記(2)記載の分解方法、

(5) ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム(*Schizophyllum*)属、プレウロタス(*Pleurotus*)属、トラメテス(*Trametes*)属、レンチナス(*Lentinus*)属、リゾクトニア(*Rhizoctonia*)属、フナリア(*Funalia*)属、フィクノポラス(*Pycnoporus*)属、メルリウス(*Merulius*)属、ミセリオプトラ(*Mycoleliophthora*)属、コプリヌス(*Coprinus*)属、アガリクス(*Agaricus*)属、フォリオタ(*Pholiota*)属、フラムリナ(*Flammulina*)属、ガノデルマ(*Ganoderma*)属、ダエダレオプシス(*Daedaleopsis*)属、ファボラス(*Favolus*)属、リオフィラム(*Lyophyllum*)属またはオーリクラリア(*Auricularia*)属に属する微生物である上記(1)記載の分解方法、

(6) 難分解性有害物質と、担体に固定化されたラッカーゼ、及び担体と共に存させたラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを接触させて該難分解性有害物質を分解する上記(1)記載の分解方法、

(7) 担体が、活性炭、炭、軽石、多孔質セラミックス、アルギン酸、イオン交換樹脂及び光架橋樹脂から選ばれる少なくとも1種からなる上記(6)記載の分解方法、

(8) 担体が、ウレタンフォーム、炭素繊維または繊維状合成樹脂を用いて編まれたシート状又は筒状である上記(6)記載の分解方法、

(9) 難分解性有害物質と、磁性体微粒子に固定化されたラッカーゼとを接触させて該難分解性有害物質を分解する上記(1)記載の分解方法、

(10) 磁性体微粒子が、マグヘマイト、マンガンフェライト、コバルトフェライト、ニッケルフェライト、亜鉛フェライト、マグнетイト及び二酸化クロムからなる群から選ばれる少なくとも1種である上記(9)記載の分解方法、

(11) 難分解性有害物質と、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを、pHが3～11の水または土壌中において接触させることを特徴とする上記(1)記載の分解方法、

(12) ハロゲン原子を1個以上有するダイオキシン類またはコプラナP C B類を分解するにあたり、該ダイオキシン類またはコプラナP C B類と、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種を、水または土壌中で接触させることを特徴とするダイオキシン類の分解方法、

(13) ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種を含有する難分解性有害物質の分解剤、

(14) 更にメディエーターを含有する上記(13)記載の分解剤、

(15) ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム(*Schizophyllum*)属、プレウロタス(*Pleurotus*)属、トラメテス(*Trametes*)属、レンチナス(*Lentinus*)属、リゾクトニア(*Rhizoctonia*)属、フナリア(*Funalia*)属、フィクノポラス(*Pycnoporus*)属、メルリウス(*Merulius*)属、ミセリオプトラ(*Myco*

eliophthora) 属、コプリヌス (Coprinus) 属、アガリクス (Agaricus) 属、フォリオタ (Pholiota) 属、フラムリナ (Flammulina) 属、ガノデルマ (Ganoderma) 属、ダエダレオプシス (Daedaleopsis) 属、ファボラス (Favolus) 属、リオフィラム (Lyophyllum) 属またはオーリクラリア (Auricularia) 属に属する微生物である上記 (13) 記載の分解剤、

(16) 担体に固定化されたラッカーゼ、及び担体と共に存させたラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種を含有する難分解性有害物質の分解剤、

(17) 担体が、活性炭、炭、軽石、多孔質セラミックス、アルギン酸、イオン交換樹脂及び光架橋樹脂から選ばれる少なくとも1種からなる上記 (16) 記載の分解剤、

(18) 担体が、ウレタンフォーム、炭素纖維または纖維状合成樹脂を用いて編まれたシート状又は筒状である上記 (16) 記載の分解剤、

(19) 磁性体微粒子に固定化されたラッカーゼを含有する難分解性有害物質の分解剤、

(20) 磁性体微粒子が、マグヘマイト、マンガンフェライト、コバルトフェライト、ニッケルフェライト、亜鉛フェライト、マグнетイト及び二酸化クロムからなる群から選ばれる少なくとも1種である上記 (19) 記載の分解剤。

(21) 難分解性有害物質が、炭素数6以上の難分解性芳香族化合物、又は1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素である上記 (13) 、(16) または (19) に記載の分解剤、

(22) 炭素数6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、ハロゲン化ビフェニル類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である上記(21)記載の分解剤、及び

(23) 1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素が、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン及びトリクロロプロピレンから選ばれる少なくとも1種である上記(21)記載の分解剤。

発明を実施するための最良の形態

以下に、本発明の実施形態について説明する。

本発明の難分解性有害物質の分解方法においては、難分解性有害物質と、ラッカーゼおよび／またはラッカーゼを生産する微生物とを接触させることによって、上記難分解性有害物質を分解し、人体あるいは他の動物に対して毒性がないか、より危険性の低い化合物に転化させて、無害化を図る。

この場合、上記難分解性有害物質を、その発生源からの直接的な排気や排水（排液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壤より分離して処理することも可能ではあるが、その取扱いには危険性が伴うことから、排気や排水（排液）、焼却灰、汚染土壤そのものを処理するのが好ましい。

本発明においては、上記難分解性有害物質として、炭素数が6以上の難分解性芳香族化合物、1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素などが挙げ

られる。

炭素数が 6 以上の難分解性芳香族化合物としては、ダイオキシン類、ハロゲン化ビフェニル類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類、フタル酸エステル類等が挙げられる。

ダイオキシン類とは、塩素原子あるいは臭素原子を 1 個以上有するダイオキシン類であり、ジベンゾー p - ダイオキシンやジベンゾフランが有する 2 個のベンゼン環における水素原子が塩素原子や臭素原子により置換された化合物である。この塩素原子あるいは臭素原子の置換数やベンゼン環における置換位置により多種多様な化合物が包含される。

これらのダイオキシン類の中でも、1 分子中に塩素原子を 4 個以上有する多塩素化物が特に人体に対する毒性が高く、そのような化合物としては、例えば、2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾ - p - ジオキシン、1, 2, 3, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾ - p - ジオキシン、1, 2, 3, 4, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾ - p - ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - ヘプタクロロジベンゾ - p - ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 - オクタクロロジベンゾ - p - ジオキシンなどのジベンゾ - p - ダイオキシンの多塩素化物；2, 3, 7, 8 - テトラクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾフラン、2, 3, 4, 7, 8 - ペンタクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 6, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン、2, 3, 4, 6, 7, 8 - ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 - ヘプタクロロジベンゾフラン、

1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9-オクタクロロジベンゾフランなどのジベンゾフランの多塩素化物がある。

また、ハロゲン化ビフェニル類としては、例えば、オルト位以外に塩素原子が置換したコプラナ(Coplanar)PCBがあり、具体的には、3, 3', 4, 4' -テトラクロロビフェノール、3, 3', 4, 4', 5 -ペンタクロロビフェノール、3, 3', 4, 4', 5, 5' -ヘキサクロロビフェノールなどの化合物が挙げられる。

上記塩素化物の中でも、最も毒性の高い化合物は、2, 3, 7, 8 -テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンである。

更に、ビスフェノール類としては、2, 2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパンや1, 1-ビス(4-ヒドロキシフェニル)シクロヘキサンなどの化合物が挙げられる。これらの化合物のうち、本発明の方法に好適なものとしては、2, 2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパンが挙げられる。

アルキルフェノール類としては、ノニルフェノール、ペンチルフェノール、オクチルフェノール、ターシャルブチルフェノールなどの化合物が挙げられる。

また、ハロゲン化フェノール類としては、ジクロロフェノール、トリクロロフェノール、テトラクロロフェノール、ペンタクロロフェノールなどの化合物が挙げられる。

更に、フタル酸エステル類としては、ジブチルフタレート、ブチルベンジルフタレート、ジ-2-エチルヘキシルフタレートなどの化合物が挙げられる。

本発明において、1~4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素としては、例えば、

モノ、ジ、トリ、テトラハロゲン化メタン、1～5個のハロゲン原子を有するハロゲン化エタン、1～3個のハロゲン原子を有するハロゲン化エチレン、2～3個のハロゲン原子を有するハロゲン化プロピレン等が挙げられる。

具体的には、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン、トリクロロプロピレン等が挙げられ、特に、トリクロロエチレンが好ましい。

本発明における上記難分解性有害物質は、その多くが動物の体内に蓄積し、種々の問題を引き起こすことが懸念されている、いわゆる外因性内分泌攪乱物質である。この物質は、環境中に偏在してホルモンと類似の作用を示し、内分泌を攪乱する化学物質を指し、極微量であっても動物の生態や人体への健康障害、例えば免疫系や内分泌系、神経系に対する影響が大きいことから、このような外因性内分泌攪乱物質を分解して無害化することが望まれている。本発明の分解方法は、難分解性有害物質の中で、上記外因性内分泌攪乱物質の分解に特に有効である。

上記難分解性有害物質の分解に用いるラッカーゼを生産する微生物としては、ラッカーゼ生産性の高い微生物、例えば、シゾフィラム (*Schizophillum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、トラメテス (*Trametes*) 属、レンチナス (*Lentinus*) 属、リゾクトニア (*Rhizoctonia*) 属、フナリア (*Funalia*) 属、フィクノポラス (*Pyrenoporus*) 属、メルリウス (*Merulius*) 属、ミセリオプラ (Myceliophthora) 属、コプリヌス (*Coprinus*)

nus) 属、アガリクス (A g a r i c u s) 属、フォリオタ (P h o l i o t a) 属、フラムリナ (F l a m m u l i n a) 属、ガノデルマ (G a n o d e r m a) 属、ダエダレオプシス (D a e d a l e o p s i s) 属、ファボラス (F a v o l u s) 属、リオフィラム (L y o p h y l l u m) 属、オーリクラリア (A u r i c u l a r i a) 属等に属する微生物を用いることができる。この場合、微生物そのものを用いてもよいし、これら菌体が生産したラッカーゼをイオン交換樹脂による分離法などにより培養液から分離して用いてもよい。

上記微生物が生産したラッカーゼには、ラッカーゼとともにリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ等を併産してなるものも含み、従って、本発明に用いるラッカーゼとしては、これにリグニンペルオキシダーゼ、マンガンペルオキシダーゼ等が混在したものも用いることができる。

さらに、本発明においては、ラッカーゼを生産する微生物の生菌体と、これら菌体の培養液から分離したラッカーゼとの混合物を用いることもできる。本発明は、これらいずれを用いても実施することができるが、ラッカーゼの活性を長期にわたって維持できるという点において、微生物の生菌体を用いる方法が最も効果的である。

上記菌体の培養液から分離したラッカーゼを用いる場合には、このラッカーゼの活性を最大限発揮させるためにメディエーターを添加することが好ましい。該メディエーターとしては、例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなどのフェノール性化合物や、2, 2' - アジノビス (3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸) などのアニリン系化合物やエトキシ脂肪酸エステル類が好適に用いられる。

上記の微生物を培養する方法については、通常の微生物の培養方法と同様に行うことができ、例えば、ポテトデキストロース液体培地、オートミール液体培地、あるいはふすま、米ぬか、木材チップ、大麦、イナワラ等を混合した固体培地を用いて行うことができる。実験室的には、ポテトデキストロース培地で5日間、20～40℃で培養するなどの方法によることができる。また、大量に培養する場合には、通常のタンクによる液体培養によるのが好ましいが、小麦全粒などの植物由来の固体成分や糖、窒素、リン、ミネラルなどを含浸させた無機多孔質担体などを用いた固体培養による方法を採用することもできる。

上記の微生物の培養においては、得られる培養物の菌濃度が、植物性有機物乾燥重量1gあたり、 1×10^2 c f u（コロニー形成単位）以上、好ましくは $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^{10}$ c f u、より好ましくは $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ c f uの範囲とする。上記濃度より少ないと、難分解性有害物質を含む水や土壤に菌を接種した際に、菌の繁殖の遅れを招くおそれがある他、既に存在する菌に対して接種した菌が優先的に繁殖することが困難になることがある。

また、これら菌の培養に際しては、菌糸体、胞子のいずれも使用できるが、通常は、培養が容易な菌糸体を用いる。

本発明においては、上記ラッカーゼまたはラッカーゼを生産する微生物を、担体に固定化されたラッカーゼ及び／又は担体と共に存させたラッカーゼを生産する微生物として使用することができる。これにより、ラッカーゼの活性を長時間持続させることができるので、汚染水中に含有されている難分解性有害物質のラッカーゼによる分解が長時間安定して行えるという効果及び比較的経済的であるという効果が得られる。

ラッカーゼを担持する担体としては、ラッカーゼを容易に吸着固定化できる担体が好ましく、その具体例としては活性炭、炭、軽石、多孔質セラミックス、アルギン酸、イオン交換樹脂、光架橋樹脂などが挙げられる。ラッカーゼを生産する微生物と共存させる担体としては、前記の担体のほか、ウレタンフォーム、炭素繊維、ナイロンなどの繊維用合成樹脂等を編んでなるシート状または筒状のものが好適である。特に、殺菌が容易で、安価である点から、活性炭やウレタンフォーム、多孔質セラミックスなどが好ましい。なお、アルギン酸、光架橋樹脂、ウレタンフォーム、炭素繊維、ナイロン等からなる固定化担体を使用する場合は、微生物菌体を固定化することはできるが、微生物の生産する酵素を固定化することができないため、活性炭、炭、イオン交換樹脂等の酵素を吸着、固定化できる担体を共存させることが好ましい。

酵素や微生物の利用効率を高めるため、ラッカーゼ及び／又は微生物を固定化し、再循環すると極めて有利となる。また、微生物を増殖させながら生産される菌体外酵素を連続的に担体に吸着できれば安価な排水処理が可能となる。

担体にラッカーゼを担持する場合には、ラッカーゼを生産する微生物の培養物中に担体を共存させてラッカーゼを担体に吸着させることにより担体に固定化するのが効果的である。この場合、担体には雑菌が混入していることがあるため、100～120℃程度で加熱殺菌処理したものを用いるのがよい。ラッカーゼを担体に担持する場合も、同様に、担体は加熱殺菌処理したもの用いるのがよい。

また、本発明においては、上記ラッカーゼを、磁性体微粒子に固定化されたラッカーゼとして使用することが好ましい。これにより

、ラッカーゼの活性を長時間持続させることができるので、汚染土壌や汚染水中に含有されている難分解性有害物質のラッカーゼによる分解が長時間安定して行えるという効果が得られる。

ラッカーゼを担持する磁性体微粒子としては、マグヘマイト、マンガンフェライト、コバルトフェライト、ニッケルフェライト、亜鉛フェライト、マグネタイトおよびニ酸化クロムから選択される磁性体微粒子が好適に用いられる。ここで用いる磁性体微粒子の粒径としては、 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下、特に $10\text{ }\mu\text{m}$ 以下であるものが、汚染土壌や汚染水への均一な分散が容易であることから好ましい。

そして、この磁性体微粒子にラッカーゼを担持する場合には、ラッカーゼを生産する微生物の培養物中に磁性体微粒子を共存させてラッカーゼを磁性体微粒子に吸着させることにより磁性体微粒子に固定化するのが効果的である。この場合、磁性体微粒子には雑菌が混入していることがあるため、 $100\sim120^\circ\text{C}$ 程度で加熱殺菌処理したもの用いるのがよい。また、微生物の培養液中でラッカーゼを固定化した磁性体微粒子を、その培養液から分離回収する必要のある場合には、磁力を与えることにより容易に分離回収することができる。

磁性体微粒子に固定化されたラッカーゼを、難分解性有害物質で汚染された土壌と接触させるにあたっては、その難分解性有害物質で汚染された土壌に、該汚染土壌 1 kg 当たりラッカーゼを固定化させた磁性体微粒子 10 mg 以上、好ましくは 100 mg 以上を加えて混合すればよい。この磁性体微粒子の添加量は多い方が効果的ではあるが、汚染土壌 1 kg 当たり 10 g を超える量を添加してもそれに見合うほどの効果の向上は見られず、汚染土壌の処理コストが高くなる。また、難分解性有害物質で汚染された水と接触させる

場合には、その汚染水に、汚染水 1 リットル当たりラッカーゼを固定化した磁性体微粒子 0.5 mg 以上、好ましくは 1 mg 以上を加えて混合するのがよい。また、この汚染水 1 リットル当たりラッカーゼを固定化した磁性体微粒子を 5 g を超える量を添加してもそれに見合うほどの効果の向上は見られず、汚染水の処理コストが高くなる。

上記微生物やその生産物であるラッカーゼを用いて前記難分解性有害物質を分解する接触反応は、その反応温度を 10 ~ 85 °C、好ましくは 20 ~ 80 °C として行なうことが好ましい。この反応温度が 10 °C 未満であると、水や土壤中での菌の増殖が遅く、またラッカーゼの反応も遅くなり、反応温度が 85 °C を超えると、酵素が失活しやすくなることがある。

また、上記反応を行う際、上記難分解性有害物質をラッカーゼまたはラッカーゼを生産する微生物と、水または土壤中で接触させることが好ましいが、上記難分解性有害物質を含む水または土壤の pH は 3 ~ 11 の範囲であることが好ましく、3.5 ~ 10.5 の範囲に調整するのがより好ましい。上記 pH が 3 未満であると、ラッカーゼの反応が遅く、また、pH が 11 を超えてもラッカーゼの反応が遅く、ラッカーゼが失活しやすくなる。したがって、水または土壤の pH が 3 ~ 11 の範囲を外れている場合には、無機または有機の酸やアルカリ物質を添加してその pH を調整し、ラッカーゼの反応を円滑に進行させるようにするのが好ましい。

難分解性有害物質を分解する上記接触反応の際、微生物またはラッカーゼの他に、銅化合物を添加してもよい。添加する銅化合物としては、例えば、硫酸銅や塩化銅などが好適に用いられる。上記銅化合物の添加量は、難分解性有害物質を含む水または土壤に対して

、0.01～1ミリモル濃度となるようにすることが好ましく、これら銅化合物の添加により、ラッカーゼの生産性や安定性がより良好になる。

上記のような難分解性有害物質の分解処理が終了した後には、フィルターや遠心分離機により、固定化菌体、固定化酵素、懸濁状の菌体および栄養源を、処理水と分離し、処理水は一般の廃水と同様に放流すればよい。また、ここで回収された固定化菌体、固定化酵素、懸濁状の菌体および栄養源は、さらに繰返して使用することができる。

以上詳細に説明したように、本発明によれば、焼却設備、製造設備などから自然界に排出される難分解性有害物質を含む排気や排水（廃液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壌などに蓄積された上記難分解性有害物質を、酵素生産の安定性に優れたラッカーゼ生産微生物または該微生物が生産したラッカーゼにより効果的に分解させて無害化することができる。

以下に、本発明を、実施例を用いて更に具体的に説明する。

〔実施例1〕

（1）ラッカーゼ生産微生物の培養

内容積250ミリリットルのマイヤーフラスコに、ポテトデキストロース24gを1リットルの水道水に溶解させて調製した液体培地50ミリリットルを注入し、シリコ栓により密栓した後、121℃で20分間殺菌処理した。

つぎに、このマイヤーフラスコを室温まで冷却し、ラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [S chiz o p h i l u m c o m m u n e ; I F O 6 5 0 5] を、1白金耳植種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、28℃に

おいて 14 日間にわたり静置培養した。

(2) ラッカーゼ活性の測定

pH 値を 4.5 に調整したマロン酸緩衝液 100 ミリモルを含有する溶液に、上記(1)で得られた培養液を加えた。ついで、これに 4-アミノアンチピリン 2 ミリモルと、フェノール 1 ミリモルを加え、30℃において反応させた。

この反応の終了後、波長 500 nm の光についての吸光度を測定し、この反応前の溶液の吸光度からの変化によりラッカーゼ活性を求めた。

このラッカーゼ活性の値は、1 cm 光路長において 1 分間に吸光度を 1 増加させる酵素量を、1 ユニットとして算出した。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、7.5 ユニット/g 乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

内容積 250 ミリリットルのマイヤーフラスコに、ポテトデキストロース 24 g を 1 リットルの水道水に溶解させて調製した液体培地 50 ミリリットルを注入した。

ついで、この培地に、ダイオキシン類として、2,3,7,8-テトラクロロジベンゾダイオキシン、および 2,3,7,8-テトラクロロジベンゾフランを、それぞれ 100 µg / 2.4 ミリリットルの濃度で含むノナン溶液を等量混合した溶液 0.24 ミリリットルを加え、さらに、界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔花王アトラス社製：T w e e n 8 0 〕を 100 µg 加えてシリコ栓で密栓した後 121℃ で 20 分間殺菌した。

つぎに、この培地に、ラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [S c h i z o p h i l l u m c o m m u n e ; I F

O - 6 5 0 5] を、1白金耳接種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、2日に1回の頻度でゆっくり攪拌しながら、28℃で20日間にわたり静置培養した。

培養終了後、トルエン50ミリリットルを加えて、ラッカーゼによるダイオキシン類の分解反応を停止させ、ついで、ここで得られた2種のダイオキシン類を抽出し、GC-MSにより定量した。

また、比較のため、ラッカーゼ生産微生物を無添加で上記と同様の操作を行い、その場合のダイオキシンの残存量を100として、式、

$$[(\text{微生物無添加時の残存ダイオキシン量} - \text{微生物添加時の残存ダイオキシン量}) / \text{微生物無添加時の残存ダイオキシン量}] \times 100 (\%)$$

により、上記シゾフィラム・コムネによるダイオキシン類の分解率を算出したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は、72%であり、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は81%であった。

[実施例2]

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-4941] を用いた他は、実施例1の(1)と同様に行った。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、12.4ユニット/g乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-4941] を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラによる2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は78%であり、また2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は88%であった。

[実施例3]

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-9791] を用いた他は、実施例1の(1)と同様にした。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、10.2ユニット/g乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-9791] を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラによる2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は79%であり、また2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は86%であった。

〔実施例 4 〕

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-30340] を用いた他は、実施例 1 の (1) と同様にした。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記 (1) で得られた培養液を用いた他は、実施例 1 の (2) と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記 (1) において得られた培養物のラッカーゼ活性は、13.9 ユニット/g 乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-30340] を用いた他は、実施例 1 の (3) と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラによる 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は 82% であり、また 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は 91% であった。

〔実施例 5 〕

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-30388] を用いた他は、実施例 1 の (1) と同様にした。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記 (1) で得られた培養液を用いた他は、実施例 1 の (2) と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記 (1) におい

て得られた培養物のラッカーゼ活性は、9.2 ユニット／g 乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor; IFO-30388] を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記トラメテス・ベルシカラによる2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は74%であり、また2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は79%であった。

[実施例6]

(1) ラッカーゼ生産微生物の培養

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [Pleurotus pulmonaris; IFO-31345] を用いた他は、実施例1の(1)と同様にした。

(2) ラッカーゼ活性の測定

上記(1)で得られた培養液を用いた他は、実施例1の(2)と同様にしてラッカーゼ活性を求めた。この結果、上記(1)において得られた培養物のラッカーゼ活性は、9.2 ユニット／g 乾物であった。

(3) ダイオキシン類の分解反応

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [Pleurotus pulmonaris; IFO-31345] を用いた他は、実施例1の(3)と同様にした。

この結果、上記プレウロタス・パルモナリスによる2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は68%で

あり、また 2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフランに対する分解率は 77 % であった。

これら実施例 1 ~ 6 の結果をまとめて第 1 表に示す。

第 1 表

実施例	微生物の種類	ラッカーゼ活性 (u/g乾物)	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン分解率 (%)	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン分解率 (%)
1	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	7.5	72	81
2	トラメテス・ベルシカラ (IFO 4941)	12.4	78	88
3	トラメテス・ベルシカラ (IFO 9791)	10.2	79	86
4	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	13.9	82	91
5	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30388)	9.2	74	79
6	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	9.2	68	77

[実施例 7 ~ 10]

内容積 500 ミリリットルのマイヤーフラスコに、100 ミリリットルのオートミール培地を注入し、シリコ栓により密栓した後、121 °C で 20 分間殺菌処理した。

つぎに、このマイヤーフラスコを室温まで冷却し、ラッカーゼ生産微生物として、フィクノポラス・コッシネウス [*Pycnopodo*]

r us c o c c i n e u s ; I F O - 4 9 2 3] を、1白金耳植種した。ついで、このラッカーゼ生産微生物を接種した培養液を、27°Cにおいて1週間静置培養した。

ついで、この培地に、難分解性物質として、アセトンに溶解した、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン 1ミリリットル(5ng含有) (実施例7)、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCB 1ミリリットル(5ng含有) (実施例8)、ビスフェノールA 1ミリリットル(50μg含有) (実施例9)、またはペンタクロロフェノール(実施例10) 1ミリリットル(1mg含有) (いずれもpH 7.5) を添加し、3分間激しく攪拌した後、再び27°Cで1週間静置培養した。

ついで、その全量を抽出し、GC-MSにより定量した。

また、比較のため、ラッカーゼ生産微生物を無添加で上記の操作を行い、その場合のダイオキシンの残存量を100として、実施例1と同様にしてダイオキシン類の分解率を算出したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は92%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5'-コプラナPCBに対する分解率は76%であり、ビスフェノールAに対する分解率は96%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は84%であった。

[実施例11~14]

ラッカーゼ生産微生物として、リゾクトニア・プラティコラ [*R hizoctonia praticola*; ATCC-16129] を用いた他は、実施例7と同様にしてラッカーゼ生産微生物を培養し、難分解性物質の分解率を測定したところ、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は96%であ

り、3, 3', 4, 4', 5, 5' -コプラナPCBに対する分解率は86%であり、ビスフェノールAに対する分解率は97%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は75%であった。

[実施例15～18]

ラッカーゼ生産微生物として、レンチナス・エドデス [*Lentinus edodes*; IFO-31864] を用いた他は、実施例7と同様にしてラッカーゼ生産微生物を培養し、難分解性物質の分解率を測定したところ、2, 3, 7, 8 -テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は72%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5' -コプラナPCBに対する分解率は78%であり、ビスフェノールAに対する分解率は92%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は87%であった。

[実施例19～22]

ラッカーゼ生産微生物として、メルリウス・トレメロータス [*Merulius tremellosus*; IFO-30385] を用いた他は、実施例7と同様にしてラッカーゼ生産微生物を培養し、難分解性物質の分解率を測定したところ、2, 3, 7, 8 -テトラクロロジベンゾダイオキシンに対する分解率は77%であり、3, 3', 4, 4', 5, 5' -コプラナPCBに対する分解率は68%であり、ビスフェノールAに対する分解率は94%であり、また、ペンタクロロフェノールに対する分解率は86%であった。

つぎに、これら実施例7～22の結果をまとめて第2表に示す。

第 2 表

実施例	微生物の種類	難分解性物質の種類	分解率 (%)
7	フィクノポラス・シンナバリナス	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン 3, 3', 4, 4', 5, 5' - コブラナPCB	9 2 7 6
9	(IFO 4923)	ビスフェノール-A	9 6
10		ペンタクロロフェノール	8 4
11	リゾクトニア・ブ	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	9 6
12	ラティコラ	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コブラナPCB	8 6
13	(ATCC 16129)	ビスフェノール-A	9 7
14		ペンタクロロフェノール	7 5
15	レンチナス・エド	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	7 2
16	デス	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コブラナPCB	7 8
17	(IFO 31864)	ビスフェノール-A	9 2
18		ペンタクロロフェノール	8 7
19	メルリウス・トレ	2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾダイオキシン	7 7
20	メロータス	3, 3', 4, 4', 5, 5' - コブラナPCB	6 8
21	(IFO 30385)	ビスフェノール-A	9 4
22		ペンタクロロフェノール	8 6

〔実施例 2 3 〕

(1) ラッカーゼ酵素液の調製

内容積 5 0 0 ミリリットルのマイヤーフラスコ 5 本に、それぞれ培地成分として、フスマ 1. 5 g と、米ぬか 1. 5 g, クヌギおが屑 0. 5 8 g、硫酸銅・5 水和物 0. 5 m g を入れ、さらに水道水 1 0 0 ミリリットルを加えた。

ついで、これらフラスコに密栓をしてオートクレーブに入れ、1

21°Cの温度において20分間殺菌した。

つぎに、この培地を室温に冷却した後、上記フラスコ5本にそれぞれラッカーゼ生産微生物として、シゾフィラム・コムネ [S chiz oph i l l u m c o m m u n e ; I F O - 6 5 0 5] を1白金耳接種し、温度25°C、回転数110r p mにおいて、3日間にわたり振とう培養した。その後、温度25°Cにおいて7日間にわたり、静置培養した。

培養終了後、これら5本のフラスコ内の培養物を集め、11,000Gにおいて遠心分離することにより、上澄み液を得た。この上澄み液のラッカーゼ活性は、12.0ユニット/gであり、リグニンパーオキシダーゼおよびマンガンパーオキシダーゼの活性は認められなかった。

ついで、得られた上澄み液に、その腐敗防止のために、10w/v%濃度の塩化ベンザルコニウム液〔日本製薬社製〕を1.0ミリリットル加え、さらに水道水を加えて全量を500ミリリットルとして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

(2) ダイオキシン類含有水の調製

流動床式の焼却炉から採取したダイオキシン類を含む都市ゴミ焼却灰200gに、2規定濃度の塩酸1リットルを加えて、2時間放置した。

ついで、この液を吸引濾過して得た上澄み液に、ジクロルメタン1リットルを加え、室温において2時間にわたり液-液抽出をした。また、吸引濾過で得られた焼却灰に、トルエン1リットルを加え、室温において、攪拌下に48時間にわたって抽出した。

つぎに、上記ジクロルメタン抽出液とトルエン抽出液を混合して、これを無水硫酸ナトリウムにより脱水した後、減圧濃縮乾固した

。さらに、この濃縮乾固物に、界面活性剤としてポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート〔花王アトラス社製：Twee n 80〕を5ミリリットルを加え、ついで水道水1リットルを加えて混合し、ダイオキシン類を含有する水を調製した。

(3) ダイオキシン類の分解反応

内容積250ミリリットルのマイヤーフラスコに、上記(2)で調製したダイオキシン類を含有する水25ミリリットルを入れ、1規定濃度の塩酸を加えて、ダイオキシン類含有水のpHを3.5に調整した。

つぎに、このダイオキシン類含有水に、上記(1)で調製したラッカーゼ酵素液25ミリリットルを加え、50℃で3時間攪拌して、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

反応終了後、ジクロルメタンを加えて反応を完全に停止させ、反応液中に残存するダイオキシン類の量を測定して、ダイオキシン類の分解率を算出した。

ここでの、ダイオキシン類の分解率の算出には、比較のためにpHを7.0とし、かつラッカーゼ酵素無添加の場合のダイオキシン類の含有量を100として、次式により算出した。

$$[(\text{酵素無添加試料} - \text{酵素添加試料}) / \text{酵素無添加試料}] \times 100 (\%)$$

この結果、この反応におけるダイオキシン類の分解率は38%であった。

[実施例24～28]

実施例23の(3)におけるダイオキシン類含有水のpHを、順次、4.5〔実施例24〕、5.5〔実施例25〕、7.0〔実施例26〕、9.0〔実施例27〕、10.0〔実施例28〕に調整

した他は、実施例 2 3 の (3) と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。なお、実施例 2 7 および 2 8においては、1 規定濃度の水酸化ナトリウムを加えてダイオキシン類含有水の pH の調整をした。

これら結果を、実施例 2 3 も含めて第 3 表に示す。

第 3 表

実施例	微生物の種類	反応液の pH	ダイオキシンの分解率 (%)
2 3	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	3 . 5	3 8
2 4	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	4 . 5	7 4
2 5	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	5 . 5	7 6
2 6	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	7 . 0	7 2
2 7	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	9 . 0	5 8
2 8	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	1 0 . 0	4 1

[実施例 2 9 ~ 3 4]

ラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [T r a m e t e s v e r s i c o l o r ; I F O - 3 0 3 4 0] を用いた他は、実施例 2 3 の (1) と同様にして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

ついで、実施例 2 3 の (2) と同様にして調製したダイオキシン類含有水を使用し、これを 1 規定濃度の塩酸または 1 規定濃度の水酸化ナトリウムにより、その pH を順次、3 . 5 [実施例 2 9] 、5 . 0 [実施例 3 0] 、6 . 0 [実施例 3 1] 、7 . 0 [実施例 3

2]、8.5 [実施例33]、9.5 [実施例34]に調整した他は、実施例23の(3)と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を、第4表に示す。

第 4 表

実施例	微生物の種類	反応液のpH	ダイオキシンの分解率(%)
29	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	3.5	42
30	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	5.0	78
31	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	6.0	82
32	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	7.0	69
33	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	8.5	62
34	トラメテス・ベルシカラ (IFO 30340)	9.5	60

[実施例35～40]

ラッカーゼ生産微生物として、プレウロタス・パルモナリス [*Pleurotus pulmonaris*; IFO-31345] を用いた他は、実施例23の(1)と同様にして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

ついで、実施例23の(2)と同様にして調製したダイオキシン類含有水を使用し、これを1規定濃度の塩酸または1規定濃度の水酸化ナトリウムにより、そのpHを順次、3.5 [実施例35]、5.0 [実施例36]、7.0 [実施例37]、8.0 [実施例38]、9.0 [実施例39]、10.0 [実施例40]に調整した

他は、実施例 2 3 の (3) と同様にして、ダイオキシン類のラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

これら結果を第 5 表に示す。

第 5 表

実施例	微生物の種類	反応液の pH	ダイオキシンの分解率 (%)
3 5	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	3 . 5	3 5
3 6	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	5 . 0	7 8
3 7	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	7 . 0	7 2
3 8	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	8 . 0	6 4
3 9	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	9 . 0	5 8
4 0	プレロタス・パルモナリス (IFO 31345)	1 0 . 0	4 6

[実施例 4 1 ~ 6 7]

培地成分として、オートミール 2 5 g、ペプトン 1 g およびショ糖 1 0 g を、水 1 リットルに懸濁させて攪拌しながら、これを内容積 5 0 0 ミリリットルのマイヤーフラスコに、1 0 0 ミリリットルづつ分注した。この操作を繰り返して、2 7 個の培地懸濁水入りのマイヤーフラスコを用意した。そして、これらマイヤーフラスコに入れた培地懸濁水のうちの一部のものには、さらにイオン交換樹脂 [住友化学工業社製 ; X A D 8 7 4] を 1 g づつ添加した。

つぎに、これらマイヤーフラスコ中の培地懸濁水を 1 2 1 ℃ において、2 0 分間の殺菌処理をした。そして、これらマイヤーフラスコ中の培地懸濁水に、第 6 表に示す各種の微生物を接種し、2 6 ℃

において、2週間にわたり微生物の培養を行った。

そして、このマイヤーフラスコ中での2週間の培養後に、この培養液中に、第6表に示す各種の難分解性有害物質を添加し、32°Cにおいて、24時間振とうして、難分解性有害物質と微生物との接触による難分解性有害物質の分解を行った。これら難分解性有害物質は所定量をアセトンに溶解させて添加した。

このようにして得られた分解生成物中の難分解性有害物質の残存量を測定して、その分解率を算出した。結果を第6表に示す。

第 6 表 - 1

実施例	微生物の種類	イオン 交換 樹脂	難分解性物質		分解率 (%)
			種類	添加量 (mg)	
41	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	有	p-ターシャリーブチルフェノール	2.3mg	9 8
42	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	無	p-ターシャリーブチルフェノール	2.3mg	9 2
43	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	有	ノニルフェノール	1.9mg	9 4
44	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	無	ノニルフェノール	1.9mg	8 9
45	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	有	4-(1-プロペニル)フェノール	2.3mg	9 9
46	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	無	4-(1-プロペニル)フェノール	2.3mg	9 7
47	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	有	ブチルフタレート	1.1mg	9 4
48	トラメテス・ベルシカラ- (IFO 9791)	無	ブチルフタレート	1.1mg	8 8
49	トラメテス・コンソールス (IFO 8348)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	9 1
50	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	有	オクチルフェノール	1.6mg	9 3
51	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	無	オクチルフェノール	1.6mg	8 8
52	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	有	ベンチルフェノール	1.2mg	8 3
53	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	無	ベンチルフェノール	1.2mg	7 1
54	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	有	ビスフェノール-A	2.4mg	9 4
55	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	9 5

第 6 表 - 2

実施例	微生物の種類	イオン 交換 樹脂	難分解性物質		分解率 (%)
			種類	添加量 (mg)	
56	シザフィラム・コムネ (IFO 6505)	有	ブチルベンジルフタレート	1.0mg	9 9
57	シザフィラム・コムネ (IFO 6505)	有	ブチルベンジルフタレート	1.0mg	9 9
58	ブレウロタス・オストレ アタス (IFO 30106)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	8 1
59	ブレウロタス・オストレ アタス (IFO 30106)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	6 8
60	ファボラス・アーキュ ラリウス (IFO 4959)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	9 6
61	フオリオタ・アディボ ーサ (IFO 30359)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	8 2
62	リオフィラム・アカステ ス(IFO 31167)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	7 3
63	フィクノボラス・コッ シネウス (IFO 4923)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	8 8
64	アガリクス・ビスピラ ス(IFO 30774)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	9 6
65	ダエダレオブシス・スチ ラシナ (IFO 4910)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	9 8
66	ガノアルマ・ルシダム (IFO 31863)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	7 9
67	オーリクラリア・オー リクラージュテ (IFO 5949)	無	ビスフェノール-A	2.4mg	8 6

〔実施例 6 8 〕

1 リットル容の分液ロートに 10 ミリモルリン酸バッファー (pH 7.4) を 100 ミリリットル入れ、1, 1, 2 - トリクロロエチレンを 20 ppm となるよう添加した後 1 時間振とうした。また、トラメテス・ベルシカラ (Trametes versicolor or : IFO 4941) をポリデキストロース液体培地で 27 °C、2 週間液体静置培養した培養液を遠心分離し、上澄み液 100 ミリリットルを上記分液ロートに添加し、次いで、分液ロートの気相を純酸素で置換した後、これを 40 °C の恒温室で 4 時間振とうした。

その後、1, 1, 2 - トリクロロエチレンをガスクロマクグラフィー質量分析 (GC - MS) 法により定量した。

同様に、上記において、培養液の上澄み液の代わりに水道水 100 ミリリットルを 1, 1, 2 - トリクロロエチレンを含む水道水に添加したものを対照区とし、これと比較して 1, 1, 2 - トリクロロエチレンの分解率を算出した。結果を第 7 表に示す。

〔実施例 6 9 〕

実施例 6 8 において、1, 1, 2 - トリクロロエチレンの代わりに 1, 1, 1 - トリクロロエチレンを用いた以外は同様にして 1, 1, 1 - トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第 7 表に示す。

〔実施例 7 0 〕

実施例 6 8 において、トラメテス・ベルシカラ (Trametes versicolor or : IFO 4941) の代わりにシゾフィラム・コムネ [Schizophyllum commune; IFO 6505] を用いた以外は同様にして 1, 1, 2 - トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第 7 表に

示す。

[実施例 7 1]

ペプトン 5 g、ショ糖 20 g 及び溶性でんぶん 20 g / リットルで水道水に懸濁し、その 100 ミリリットルを 500 ミリリットル容のスリガラス口付マイヤーフラスコに入れ、シリコ栓で密栓後 121 °C で 20 分間殺菌した。この容器にリゾクトニア・プラティコラ (*Rhizoctonia puraticola*; ATCC 16129) を 1 白金耳接種し、27 °C で 14 日間静置培養した。培養終了後、4 °C の恒温振とう浴槽で冷却した後、これに 1, 1, 1 - トリクロロエチレン 10 マイクロリットルを添加した。容器の口をガラスキャップに換え、4 °C で 10 分間振とうし、1, 1, 1 - トリクロロエチレンの含有量をガスクロマクグラフィー質量分析 (GC-MS) 法により定量した。この値を初期値とした。

その後、直ちに 40 °C の恒温振とう浴槽で 4 時間振とうした後、液体中の 1, 1, 1 - トリクロロエチレン含有量をガスクロマクグラフィー質量分析法により定量した。結果を第 7 表に示す。

[実施例 7 2]

実施例 7 1において、リゾクトニア・プラティコラ (*Rhizoctonia puraticola*; ATCC 16129) の代わりにフナリア・ツロッギー [*Funalia trogii*; ATCC 200800] を用い、更に 1, 1, 1 - トリクロロエチレンの代わりに 1, 1, 2 - トリクロロエチレンを用いた以外は同様にして 1, 1, 2 - トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第 7 表に示す。

[実施例 7 3]

内容積 500 ミリリットルのマイヤーフラスコ 5 本に、それぞれ

培地成分として、フスマ 1. 5 g と、米ぬか 1. 5 g、クヌギおが屑 0. 58 g、硫酸銅・5水和物 0. 5 mg を入れ、さらに水道水 100 ミリリットルを加えた。

ついで、これらフラスコに密栓をしてオートクレーブに入れ、121°C の温度において 20 分間殺菌した。

この培地を室温に冷却した後、上記フラスコ 5 本にそれぞれラッカーゼ生産微生物として、トラメテス・ベルシカラ [Trametes versicolor : IFO 4941] を 1 白金耳接種し、温度 25°C で 3 日間にわたり振とう培養をした。その後、温度 25°C において 10 日間にわたり、静置培養した。

培養終了後、これら 5 本のフラスコ内の培養物を遠心分離することにより、上澄み液を得た。ついで、得られた上澄み液に、メディエーターとして 1-ヒドロキシベンゾトリアゾールを 1 ミリモルとなるように加え、さらに水道水を加えて全量を 500 ミリリットルとして、ラッカーゼ酵素液を調製した。

一方、内容積 1 リットルの分液ロートに、10 ミリモルリン酸バッファー (pH 8.5) を 100 ミリリットル入れ、気相を純酸素で置換した後、ジクロロメタンを 50 ppm となるように添加し、10 分間振とうした。

つぎに、このジクロロメタン含有水に、上記調製したラッカーゼ酵素液 1 ミリリットルを加え、40°C の恒温振とう浴槽で 4 時間振とうして、ジクロロメタンのラッカーゼ酵素による分解反応を行った。

反応終了後、反応液中に残存するジクロロメタンの量をガスクロマクグラフィー質量分析 (GC - MS) 法により測定して、その分解率を算出した。

なお、上記においては、ラッカーゼ酵素液の代わりに水道水をジクロロメタン含有水に添加したものを対照区とした。結果を第7表に示す。

[実施例 7 4]

実施例 7 3において、ジクロロメタンの代わりに 1, 1, 1-トリクロロエチレンを用いた以外は同様にして 1, 1, 1-トリクロロエチレンの分解を行い、その分解率を測定した。結果を第7表に示す。

第 7 表

実施例	微生物の種類	難分解性物質の種類	分解率 (%)
68	トラメテス・ベルシカラ (IFO 4941)	1, 1, 2-トリクロロエチレン	4.9
69	トラメテス・ベルシカラ (IFO 4941)	1, 1, 1-トリクロロエチレン	4.2
70	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	1, 1, 2-トリクロロエチレン	3.8
71	リゾクトニア・プラティコラ (ATCC 16129)	1, 1, 1-トリクロロエチレン	7.8
72	フナリア・ツロッギー ¹ (ATCC 200800)	1, 1, 2-トリクロロエチレン	5.3
73	トラメテス・ベルシカラ (IFO 4941)	ジクロロメタン	2.8
74	トラメテス・ベルシカラ (IFO 4941)	1, 1, 1-トリクロロエチレン	6.9

〔実施例 7 5〕

焼却場の洗煙排水（21000～24000 pg / TEQ / リットルの洗煙排水）を水酸化ナトリウムで中和し、汚染水とした。

2 cm 角のウレタンフォームにポテトデキストロース液体培地を含浸させ、無菌フィルター付ステンレス培養器に 200 個入れ、121°C で 20 分間殺菌した。

このウレタンフォームをあらかじめ殺菌した直径 19 cm のガラスシャーレに 10 個ずつ移し、トラメテス・ベルシカラー（IFO 9791）、シゾフィラム・コムネ（IFO 6505）の種菌を接種し、27°C で 2 週間培養し、菌床を作った。

・排水の連続分解

直径 10 cm の内部に直径 7 cm のガラス管を有する二重管カラム（外部の長さ 25 cm、内部の長さ 12 cm）に排水導入、空気導入、栄養源添加の 3 ラインを底部に取り付け、ステンレス管等の付属品を取り付け、全体を 121°C オートクレーブで殺菌した。このガラス管の内管に先に培養したウレタン菌床 12 個を入れた。同時に加熱殺菌した平均粒径 2 mm の粒状活性炭 10 g をガラス管底部に入れた。

雑菌の混入を防止するため、通気は 0.4 μm のフィルターを通して行い、二重管の上部には脱着可能なスリガラス付排気用蓋を取り付けた。なお、殺菌した排水及び栄養源は微量ポンプで定量的に流した。

この設備を前部、後部の 2 連に連結し、後部から排水と空気を抜き出した。本設備を 27°C の恒温室に設置し、連続運転を行った。運転条件としては、21000～24000 pg - TEQ / リットルの洗煙排水を用いた。洗煙排水の流量は 1 リットル / 日、栄養源

の流量は 5 0 m l / 日、通気量は 5 0 m l / 分として実施した。

栄養源の組成は次の通りであった。

・ 栄養源の組成

カルボキシメチルセルロース	1 0 g
可溶性デンプン	2 0 g
ペプトン	1 0 g
K H ₂ P O ₄	2 g
N a H P O ₄	1 g
M g S O ₄	0. 2 g
水道水	1 リットル

同じ設備を 3 組用意し実験を行った。排水は 3 日間貯め、ダイオキシン類を抽出した。1 ヶ月後に菌床、活性炭、ガラス容器、シリコンチューブ毎にトルエンで洗浄抽出し、そしてダイオキシン量を算出した。ダイオキシンの定量は常法により、ガスクロマトグラフィー質量分析により行い、その結果から、ダイオキシンの分解率を算出した。結果は次の通りであった。

<u>使用微生物</u>	<u>活性炭</u>	<u>ダイオキシン分解率 (TEQ%)</u>
トラメテス・ベルシカラ (<i>Trametes versicolor</i>) (IFO 9791)	有	9 3
シザフィラム・コムネ (<i>Shizophyllum commune</i>) (IFO 6505)	有	9 5

〔実施例 7 6 〕

(1) 微生物の培養

培地成分として、水 1 リットル当たり、オートミールを 25 g、ポリペプトンを 10 g、 $\text{K H}_2\text{P O}_4$ を 1.5 g、 $\text{Mg S O}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.5 g、チアミン塩酸塩を 2.0 g および Cu S O_4 を 20 mg の割合で水道水に溶解し、0.1 規定濃度の塩酸により pH を 5.6 に調整して培地を調製した。

次に、この培地 100 ミリリットルを内容積 500 ミリリットルのマイヤーフラスコに入れ、121°Cにおいて 15 分間の殺菌処理をした。そして、この培地にトラメテス・ベルシカラ (*Trametes versicolor* IFO 4937) 1 白金耳を植菌し、30°Cにおいて 14 日間にわたり静置培養した。

(2) 酵素の活性の測定

上記(1)において得られた培養液について、液中のラッカーゼ活性を測定したところ 12.4 nkat/ml であった。

(3) 酵素の安定性の評価

上記(1)において得られた培養液に、130°Cで 24 時間の乾熱殺菌処理をしたマグヘマイト微粒子 2.5 g を無菌的に加え、直ちに 180 rpm で 1 時間の攪拌処理をして、マグヘマイト微粒子に酵素を吸着させて固定化した。

次に、内容積 2 リットルのビーカーに、無殺菌の黒ボク土壌 (水分含有量: 14 質量%) 280 g を入れ、さらに上記のマグヘマイト微粒子に酵素を吸着させたものを含む液を加えて、スパチュラーで充分に混合した。そして、これに水道水を加えて土壌全体の重さを 400 g とした。

ついで、この土壌を入れたビーカーの開口部をアルミホイルで

覆い、25℃の恒温槽に入れて、1日に1回、ビーカー内の土壤をスパチュラーでゆっくり攪拌した。この攪拌時に、水分の蒸散量が多い場合には、その蒸散量に見合う量の水道水を補充した。

そして、この土壤を経時的にサンプリングして、土壤中の酵素活性を測定することにより、酵素の安定性の評価をした。土壤試料のサンプリングは、酵素を固定化したマグヘマイト微粒子を土壤に添加した時点から、4時間後、24時間後、48時間後、72時間後、168時間後の5回実施した。これらの結果を第8表に示す。

第 8 表

磁性体 微粒子 の添加 の有無	磁性体微粒子 の添加から活 性測定までの 時間 (hr)	ラッカーゼ活性 (kat/g 土壤)
有	4	12.0
有	24	12.2
有	48	11.8
有	72	11.6
有	168	10.4

(4) 塩素化ダイオキシン汚染土壤の浄化

塩素化ダイオキシン汚染土壤として、森林地帯の山間部に建設されている都市ゴミ焼却炉の周辺の雑草が生育した傾斜地において、地表より20cmの深さまでの土壤を剥離して採取した。そして、この土壤を1cmのマス目の金属篩にかけて、石などの夾雑物を除き、塩素化ダイオキシン汚染土壤（平均水分含有量：21質量%）を採取した。

次に、この塩素化ダイオキシン汚染土壤について、環境庁作成のダイオキシンに係る土壤調査暫定マニュアルに準じて、この汚染土

壤に含まれている塩素化ダイオキシン類の同族体の分析をした。この結果、塩素化ダイオキシン類の同族体として、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン、1, 2, 3, 7, 8-ペンタクロロジベンゾ-p-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ジオキシン、1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾ-p-ジオキシン、1, 2, 3, 7, 8, 9-ヘキサクロロジベンゾ-p-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾ-p-ジオキシン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-オクタクロロジベンゾ-p-ジオキシン、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 7, 8-ペニタクロロジベンゾフラン、2, 3, 4, 7, 8-ペニタクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、2, 3, 4, 6, 7, 8-ヘキサクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 7, 8-ヘプタクロロジベンゾフラン、1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-オクタクロロジベンゾフランの存在が確認された。これら塩素化ダイオキシン類について、含有割合を、2, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシンの活性に対する毒性等量〔T EQ〕で算出した結果、上記塩素化ダイオキシン汚染土壤の〔T EQ〕の値は、1860ピコグラム／グラム土壤であった。

次に、この塩素化ダイオキシン汚染土壤10kgを75℃で2時間加熱処理した後、16時間放冷し、再度75℃で2時間加熱処理して殺菌した。そして、この汚染土壤に、微生物の栄養源として、フスマ（水分含有率：12質量%）800gとクヌギオガクズ（水

分含有率：16質量%）200gの混合物に水道水600ミリリットルを加えて121℃で20分間加熱殺菌処理したものを混合した。このようにして調製した栄養源入りの汚染土壌120gを、内容積2リットルのビーカーに入れ、さらに磁性体微粒子としてマグヘマイト微粒子100mgを加えて混合し、さらに滅菌水を加えて全体を200gとした。

次いで、このビーカー内の土壌に、フスマ20gとクヌギオガクズ20gおよび水50ミリリットルの割合からなる殺菌処理済の種菌用培地に30℃で14日間培養したトラメテス・ベルシカラ（*Trametes versicolor* IF04937）の培養物1gを接種した。このビーカー内の植菌済の汚染土壌は、3日に1度の割合で土壌全体をゆっくりと攪拌し、その際に蒸発水分量に見合う量の滅菌水と若干量の栄養源を補充した。

このようにして、2ヶ月間にわたり、汚染土壌中でトラメテス・ベルシカラ菌を増殖させて酵素を放出させるとともに、マグヘマイト微粒子に吸着して固定化された酵素による塩素化ダイオキシン類の分解を行った。そして、この汚染土壌へのトラメテス・ベルシカラ菌の植菌から2ヶ月経過後の土壌中の塩素化ダイオキシン類を定量した。これより、塩素化ダイオキシン類の残存率（TEQ換算%）を算出すると、36%であった。これらの結果を第9表に示す。

[実施例77]

実施例76の(4)において汚染土壌に加えたマグヘマイト微粒子の量を1,000mgに変更した他は、実施例76と同様にした。結果を第9表に示す。

[実施例78]

実施例 7 6 の (4) において汚染土壤に加えたマグヘマイト微粒子の量を 10,000 mg に変更した他は、実施例 7 6 と同様にした。結果を第 9 表に示す。

[実施例 7 9]

実施例 7 6 の (4) において汚染土壤に加えたマグヘマイト微粒子の量を 100 mg に変更し、かつ微生物をトラメテス・ベルシカラ (Trametes versicolor IFO 9791) 菌に変更した他は、実施例 7 6 と同様にした。結果を第 9 表に示す。

[実施例 8 0]

汚染土壤に加えたマグヘマイト微粒子の量を 1,000 mg に変更した他は、実施例 7 9 と同様にした。結果を第 9 表に示す。

[実施例 8 1]

実施例 7 6 の (4) において汚染土壤に加えたマグヘマイト微粒子の量を 1,000 mg に変更し、かつ微生物をトラメテス・ベルシカラ (Trametes versicolor IFO 30388) 菌に変更した他は、実施例 7 6 と同様にした。結果を第 9 表に示す。

[実施例 8 2]

実施例 7 6 の (4) において用いた微生物をシゾフィラム・コムネ (Schizophyllum commune IFO 6505) 菌に変更した他は、実施例 7 6 と同様にした。結果を第 9 表に示す。

[実施例 8 3]

汚染土壤に加えたマグヘマイト微粒子の量を 1,000 mg に変更した他は、実施例 8 2 と同様にした。結果を第 9 表に示す。

第 9 表

実施例	微生物の種類	磁性体 微粒子 の種類	磁性体微粒子 の添加量 (m g)	塩素化ダイオ キシン残存率 (%)
76	トラメテス・ベルシカラー (IFO 4937)	マグヘマイト	1 0 0	3 6
77	トラメテス・ベルシカラー (IFO 4937)	マグヘマイト	1 , 0 0 0	3 1
78	トラメテス・ベルシカラー (IFO 4937)	マグヘマイト	1 0 , 0 0 0	2 6
79	トラメテス・ベルシカラー (IFO 9791)	マグヘマイト	1 0 0	4 0
80	トラメテス・ベルシカラー (IFO 9791)	マグヘマイト	1 , 0 0 0	3-3
81	トラメテス・ベルシカラー (IFO 30388)	マグヘマイト	1 , 0 0 0	3 6
82	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	マグヘマイト	1 0 0	4 2
83	シゾフィラム・コムネ (IFO 6505)	マグヘマイト	1 , 0 0 0	3 6

〔実施例 8 4 〕

(1) 微生物の培養

微生物として、トラメテス・ベルシカラー (*Trametes versicolor* IFO 9791) 菌を用いた他は、実施例 76 の (1) と同様にして、培養液を得た。

(2) 酵素の活性の測定

上記 (1) において得られた培養液について、液中のラッカーゼ活性を測定したところ、14.1 nkat / ml であった。

(3) 酵素の安定性の評価

上記 (1) において得られた培養液を用い、かつマグヘマイト微

粒子に代えてコバルトフェライト微粒子 2.5 g を用いた他は、実施例 7 6 の (3) と同様にして、酵素の安定性の評価をした。なお、土壌試料のサンプリングは、酵素を固定化したコバルトフェライト微粒子を土壌に添加した時点から、4 時間後と 168 時間後の 2 回実施した。結果を第 10 表に示す。

(4) 塩素化ダイオキシン汚染土壌の浄化

実施例 7 6 の (4) と同様にして調製した栄養源入りの汚染土壌に、コバルトフェライト微粒子 100 mg を加えて混合し、トラメテス・ベルシカラー (*Trametes versicolor* IF O 9791) 菌の培養物 1 g を接種した他は、実施例 7 6 の (4) と同様にした。結果を第 11 表に示す。

〔実施例 8 5〕

(1) 酵素の安定性の評価

実施例 8 4 の (3) において用いたコバルトフェライト微粒子に代えて、マンガンフェライト微粒子を用いた他は、実施例 8 4 の (3) と同様にして、酵素の安定性の評価をした。結果を第 10 表に示す。

(2) 塩素化ダイオキシン汚染土壌の浄化

実施例 8 4 の (4) において用いたコバルトフェライト微粒子に代えて、マンガンフェライト微粒子を用いた他は、実施例 8 4 の (4) と同様にした。結果を第 11 表に示す。

〔実施例 8 6〕

(1) 酵素の安定性の評価

実施例 8 4 の (3) において用いたコバルトフェライト微粒子に代えて、ニッケルフェライト微粒子を用いた他は、実施例 8 4 の (3) と同様にして、酵素の安定性の評価をした。結果を第 10 表に

示す。

(2) 塩素化ダイオキシン汚染土壤の浄化

実施例 8 4 の (4) において用いたコバルトフェライト微粒子に代えて、ニッケルフェライト微粒子を用いた他は、実施例 8 4 の (4) と同様にした。結果を第 11 表に示す。

[実施例 8 7]

(1) 酵素の安定性の評価

実施例 8 4 の (3) において用いたコバルトフェライト微粒子に代えて、亜鉛フェライト微粒子を用いた他は、実施例 8 4 の (3) と同様にして、酵素の安定性の評価をした。結果を第 10 表に示す。

(2) 塩素化ダイオキシン汚染土壤の浄化

実施例 8 4 の (4) において用いたコバルトフェライト微粒子に代えて、亜鉛フェライト微粒子を用いた他は、実施例 8 4 の (4) と同様にした。結果を第 11 表に示す。

第 10 表

磁性体 微粒子	磁性体微粒子の添加 から活性測定までの 時間 (h r)	ラッカーゼ活性 (k a t / g 土壌)
コバルトフェ ライト	4	1 4 . 6
	1 6 8	8 . 6
マンガンフェ ライト	4	1 3 . 4
	1 6 8	7 . 7
ニッケルフェ ライト	4	1 4 . 4
	1 6 8	7 . 2
亜鉛フェ ライト	4	1 3 . 7
	1 6 8	6 . 8

第 11 表

実施例	微生物の種類	磁性体微粒子の種類	磁性体微粒子の添加量 (m g)	塩素化ダイオキシン残存率 (%)
84	トラメテス・ベルシカラー (IFO 9791)	コバルトフェライト	100	53
85	トラメテス・ベルシカラー (IFO 9791)	マンガンフェライト	100	54
86	トラメテス・ベルシカラー (IFO 9791)	ニッケルフェライト	100	49
87	トラメテス・ベルシカラー (IFO 9791)	亜鉛フェライト	100	52

産業上の利用可能性

本発明によれば、焼却設備、製造設備などから自然界に排出される難分解性有害物質を含む排気や排水（廃液）、焼却灰、さらにこれらによって汚染された土壤などに蓄積された上記難分解性有害物質を、酵素生産の安定性に優れたラッカーゼ生産微生物または該微生物が生産したラッカーゼにより効果的に分解させて無害化することができる。本発明は、特に、農薬中の特定成分、化学工業における原料や製品、更にゴミや産業廃棄物の焼却処理時に生成する特定の化学物質などの難分解性有害物質、紙、パルプ工業、精密機械関連産業等において洗浄剤などとして用いられている難分解性有害物質などの分解に有效地に用いられる。

請求の範囲

- (1) 難分解性有害物質と、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを接触させて該難分解性有害物質を分解する難分解性有害物質の分解方法。
- (2) 難分解性有害物質が、炭素数6以上の難分解性芳香族化合物、又は1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素である請求の範囲第1項記載の分解方法。
- (3) 炭素数6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、ハロゲン化ビフェニル類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である請求の範囲第2項記載の分解方法。
- (4) 1～4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素が、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン及びトリクロロプロピレンから選ばれる少なくとも1種である請求の範囲第2項記載の分解方法。
- (5) ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム (*Schizophyllum*) 属、プレウロタス (*Pleurotus*) 属、

トラメテス (Trametes) 属、レンチナス (Lentinus) 属、リゾクトニア (Rhizoctonia) 属、フナリア (Funalia) 属、フィクノボラス (Pycnoporus) 属、メルリウス (Merulius) 属、ミセリオプトラ (Myceliophthora) 属、コプリヌス (Coprinus) 属、アガリクス (Agaricus) 属、フォリオタ (Pholiota) 属、フラムリナ (Flammulina) 属、ガノデルマ (Ganoderma) 属、ダエダレオプシス (Daedaleopsis) 属、ファボラス (Favolus) 属、リオフィラム (Lyophyllum) 属またはオーリクラリア (Auricularia) 属に属する微生物である請求の範囲第1項記載の分解方法。

(6) 難分解性有害物質と、担体に固定化されたラッカーゼ、及び担体と共に存させたラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを接触させて該難分解性有害物質を分解する請求の範囲第1項記載の分解方法、

(7) 担体が、活性炭、炭、軽石、多孔質セラミックス、アルギン酸、イオン交換樹脂及び光架橋樹脂から選ばれる少なくとも1種からなる請求の範囲第6項記載の分解方法。

(8) 担体が、ウレタンフォーム、炭素繊維または繊維状合成樹脂を用いて編まれたシート状又は筒状である請求の範囲第6項記載の分解方法。

(9) 難分解性有害物質と、磁性体微粒子に固定化されたラッカ

ーゼとを接触させて該難分解性有害物質を分解する請求の範囲第1項記載の分解方法。

(10) 磁性体微粒子が、マグヘマイト、マンガンフェライト、コバルトフェライト、ニッケルフェライト、亜鉛フェライト、マグнетイト及び二酸化クロムからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求の範囲第9項記載の分解方法。

(11) 難分解性有害物質と、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを、pHが3～11の水または土壌中において接触させることを特徴とする請求の範囲第1項記載の分解方法。

(12) ダイオキシン類またはコプラナP C B類と、ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種とを、水または土壌中で接触させるダイオキシン類の分解方法。

(13) ラッカーゼ及びラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種を含有する難分解性有害物質の分解剤。

(14) 更にメディエーターを含有する請求の範囲第13項記載の分解剤。

(15) ラッカーゼを生産する微生物が、シゾフィラム (*S c h i z o p h i l l u m*) 属、プレウロタス (*P l e u r o t u s*) 属、トラメテス (*T r a m e t e s*) 属、レンチナス (*L e n t i n*

us) 属、リゾクトニア (Rhizoctonia) 属、フナリア (Funalia) 属、フィクノボラス (Pycnoporus) 属、メルリウス (Merulius) 属、ミセリオプトラ (Myceliophthora) 属、コプリヌス (Coprinus) 属、アガリクス (Agaricus) 属、フォリオタ (Pholiota) 属、フラムリナ (Flammulina) 属、ガノデルマ (Ganoderma) 属、ダエダレオプシス (Daedaleopsis) 属、ファボラス (Favolus) 属、リオフィラム (Lophylum) 属またはオーリクラリア (Auricularia) 属に属する微生物である請求の範囲第13項記載の分解剤。

(16) 担体に固定化されたラッカーゼ、及び担体と共に存させたラッカーゼを生産する微生物から選ばれる少なくとも1種を含有する難分解性有害物質の分解剤。

(17) 担体が、活性炭、炭、軽石、多孔質セラミックス、アルギン酸、イオン交換樹脂及び光架橋樹脂から選ばれる少なくとも1種からなる請求の範囲第16項記載の分解剤。

(18) 担体が、ウレタンフォーム、炭素繊維または纖維状合成樹脂を用いて編まれたシート状又は筒状である請求の範囲第16項記載の分解剤。

(19) 磁性体微粒子に固定化されたラッカーゼを含有する難分解性有害物質の分解剤。

(20) 磁性体微粒子が、マグヘマイト、マンガンフェライト、コバルトフェライト、ニッケルフェライト、亜鉛フェライト、マグネタイト及び二酸化クロムからなる群から選ばれる少なくとも1種である請求の範囲第19項記載の分解剤。

(21) 難分解性有害物質が、炭素数6以上の難分解性芳香族化合物、又は1~4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素である請求の範囲第13項、第16項または第19項に記載の分解剤。

(22) 炭素数6以上の難分解性芳香族化合物が、ダイオキシン類、ハロゲン化ビフェニル類、ビスフェノール類、アルキルフェノール類、ハロゲン化フェノール類及びフタル酸エステル類から選ばれる少なくとも1種である請求の範囲第21項記載の分解剤。

(23) 1~4個の炭素原子及び少なくとも1個のハロゲン原子からなる難分解性ハロゲン化炭化水素が、モノクロロメタン、ジクロロメタン、トリクロロメタン、テトラクロロメタン、モノクロロエタン、ジクロロエタン、トリクロロエタン、モノクロロエチレン、ジクロロエチレン、トリクロロエチレン及びトリクロロプロピレンから選ばれる少なくとも1種である請求の範囲第21項記載の分解剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ B09B3/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, A62D3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ B09B3/00, B09B5/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, C02F3/00, A62D3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US, 4765901, A (Pacques B.V., Balk, Netherlands), 23 August, 1988 (23.08.88), Claims & JP, 62-237999, A Claims & EP, 238148, A & NL, 8600723, A & FI, 8701215, A & DE, 3764679, G & ES, 2017700, B & CA, 1307361, C A & SU, 4202256, A	1-3, 5-11, 13-22
PX	JP, 2000-186272, A (Sanrou TACHIBANA), 04 July, 2000 (04.07.00), Claims; Par. Nos. 1, 14 (Family: none)	1-3, 5-18, 21-22
X	WO, 9728257, A (NOVO NORDISK A/S), 07 August, 1997 (07.08.97), Claims & JP, 9-206071, A Claims & AU, 9714382, A & EP, 877800, A A & CN, 1209839, A	1-3, 5-11, 13-14 , 16-22
A		1-23

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

“A”	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“T”	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“E”	earlier document but published on or after the international filing date	“X”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“L”	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“Y”	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“O”	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	“&”	document member of the same patent family
“P”	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
19 December, 2000 (19.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06566

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 9715354, A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT), 01 May, 1997 (01.05.97), Claims; page 3, line 16 & JP, 11-514274, A Claims; page 5, line 15 & AU, 9672902, A & EP, 858357, A & CN, 1200678, A & DE, 59602194, G & US, 6046045, A & KR, 99064009, A & HU, 9802982, A & ES, 2135254, T	1-2, 5-11, 13-18 , 21
A		1-23

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/06566

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' B09B3/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, A62D3/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C17 B09B3/00, B09B5/00, B01D53/34, C02F1/58, C02F1/72, C02F3/00, A62D3/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	US, 4765901, A (Pacques B. V., Balk, Netherlands) 23.8月. 1988 (23.08.88), 請求の範囲 & JP, 62-237999, A, 請求の範囲 & EP, 238148, A & NL, 8600723, A & FI, 8701215, A & DE, 3764679, G & ES, 2017700, B & CA, 1307361, C & SU, 4202256, A	1-3、 5-11、 13-22
A		1-23
P X	JP, 2000-186272, A (橘燐郎) 4.7月. 2000 (04.07.00), 請求の範囲, 段落1及び14 (ファミリなし)	1-3、 5-18、 21-22

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 12. 00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官(権限のある職員)

中野 孝一



4 D 9153

電話番号 03-3581-1101 内線 3421

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 9728257, A (NOVO NORDISK A/S) 7.8月. 1997 (07.08.97), 請求の範囲 & JP, 9-206071, A, 請求の範囲 & AU, 9714382, A & EP, 877800, A & CN, 1209839, A	1-3, 5-11, 13-14, 16-22 1-23
A		
X	WO, 9715354, A (BAYER AKTIENGESELLSCHAFT) 1.5月. 1997 (01.05.97), 請求の範囲, 第3頁第16行 & JP, 11-514274, A, 請求の範囲, 第5頁第15行 & AU, 9672902, A & EP, 858357, A & CN, 1200678, A & DE, 59602194, G & US, 6046045, A & KR, 99064009, A & HU, 9802982, A & ES, 2135254, T	1-2, 5-11, 13-18, 21
A		1-23